

JP58049311

Publication Title:

PREPARATION OF STABLE LIPOSOME

Abstract:

Abstract of JP58049311

**PURPOSE:**To prevent the destruction of liposome caused by the attack with the phospholipase in the living body, and to enable the selective and concentrated transfer of drug to the aimed organ, by covering the surface of a liposome membrane with an ester of polysaccharide and fatty acid. **CONSTITUTION:**The surface of a single-layered or multi-layered liposome membrane composed of only a lipid (e.g. phosphatidylcholine) or of lipid and sterol, is coated with the ester of a polysaccharide (e.g. dextran, amylopectine, pullulan, chitosan, etc.) and fatty acid (e.g. lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, etc.). The coating can be carried out by adding an aqueous solution containing said ester to an aqueous solution containing liposome, and stirring the mixture. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

---

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—49311

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 9/10  
9/56

識別記号

庁内整理番号  
7057—4C  
7057—4C

⑬ 公開 昭和58年(1983)3月23日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ 安定なるリボソームの製造法

⑯ 発明者 岩本清

福岡県田川郡香春町採銅所3549

⑰ 特 願 昭56—147587

⑰ 出 願 人 エーザイ株式会社

⑱ 出 願 昭56(1981)9月18日

東京都文京区小石川4丁目6番

⑲ 発明者 砂本順三

10号

長崎市横尾4—16—10

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

安定なるリボソームの製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) リボソーム膜の表面を多糖質と脂肪酸とのエステルによって被覆することを特徴とする安定なるリボソームの製造法。
- (2) 多糖質がデキストラン、アミロペクテン、プルラン、デキストラン硫酸、キト酸、プルラン硫酸からなる群より選択される1乃至6種の組合せである特許請求の範囲第1項記載の安定なるリボソームの製造法。
- (3) 脂肪酸がラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸からなる群より選択される1乃至4種の組合せである特許請求の範囲第1項または第2項記載の安定なるリボソームの製造法。
- (4) リボソーム膜が脂質または脂質とステロ-

ルより構成されるリボソーム膜である特許請求の範囲第1項乃至第3項記載の安定なるリボソームの製造法。

- (5) 脂質がホスファチジルコリンである特許請求の範囲第4項記載の安定なるリボソームの製造法。

- (6) ホスファチジルコリン1重量部に対してプルランとパルミチン酸とのエステルが1/3～1重量部である特許請求の範囲第5項記載の安定なるリボソームの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はリボソーム膜の表面を多糖質と脂肪酸とのエステルによって被覆することを特徴とする安定なリボソームの製造法に関する。

医学、薬学の分野において、いわゆる臓器指向型製剤への関心が徐々に高まるに伴ない、この目的を達成するための一つ的手段としてリボソームを利用する技術が重要視されるに至っている。すなわち、リボソームは臓器毎にそれぞれ固有のリ

ボソームとして存在しているという点に着目し、所定の薬物を所定のリボソームに含有せしめて投与することにより、薬物を目標臓器に選択的かつ集中的に運搬せしめようと意図する技術が開発されつつあるのである。

リボソームを薬物運搬体として利用する手段は従来から知られており、例えば特開昭52-143218、特開昭52-151718、特開昭53-133616、特公昭55-8488における発明を挙げることができる。いずれもリボソームを担体として、これに特定の生体成分あるいは医薬成分を保持させる技術に関する発明であり、いずれこれらの技術は医学薬学における他の生体成分、医薬成分にまで応用されるものと予想される。

しかしながら、当該技術における一つの問題点として、次のごとき課題が従来より指摘されている。すなわち、生体成分または医薬成分を含有するリボソームは、それが目標臓器に到達する以前に、生体内ホスホリパーゼの攻撃により破壊し、

内容成分を放出してしまうということである。事実、後記実施例の対照試料におけるごとく、リボソームの破壊による内容成分の放出は著しいものであることが観察される。従って、生体内ホスホリパーゼの攻撃によるリボソームの破壊を適当な方法により防止することのできる手段が提示されることが必要であり、さらには当該手段によって目標臓器における内容成分の放出が急速なものにも、あるいは緩徐なものにもそれぞれ適宜制御されることが望まれるのである。つまり当該技術が医学薬学の分野において実用的に完成されるためには、リボソーム自体を生体内過程において安定に維持し、かつ必要に応じ目標臓器における内容成分の放出を計画的に制御することのできる手段が提供されなくてはならないのである。

かかる実情にかんがみ本発明者はリボソーム、とりわけリボソーム中のリン脂質を外部攻撃から保護する方法について検討し、その結果、リボソームを多糖質と脂肪酸とのエステルによって被覆することにより、所期の目的が達成されることを

知り、本発明を完成した。

従って、本発明は多糖質と脂肪酸とのエステルによって被覆することを特徴とする安定なるリボソームを製造する方法である。

以下に本発明を説明する。

本発明においてリボソームとは、脂質、とりわけリン脂質のみよりあるいはリン脂質とステロールより構成される単層リボソームおよび多層リボソームであり、リボソームの製造法として従来公知の方法により調整されたものを言う。従って例えばナス型フラスコに卵黄レシチンの薄膜を作成し、ガラスビーズを入れてはがし、リボソーム膜を形成させて得られるリボソームなどが含まれる。

リボソームに担持される内容物質は、水溶性および脂溶性のいずれでもよい。ただし、水溶性物質はリボソームの内腔に、また脂溶性物質はリボソーム膜にそれぞれ収納される。

次に本発明に係る多糖質とは分子量が4万以上のポリサッカライドを言い、具体的にはデキス

ラン、アミロペクテン、プルラン、デキストラン硫酸、キト酸、プルラン硫酸等である。本発明において多糖質は分子量の異なる二種類以上のものの組合わせあるいはアミロペクテンとデキストランの組合わせのごとく複数の多糖質を合わせて使用してもよい。

また本発明に係る脂肪酸はラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸からなる群より選択される1乃至4種の組合わせである。本発明に係るエステルをもってリボソームを被覆した場合に、脂肪酸のアルキル鎖はリボソームの脂質層に楔形に配向することが推定される。従って上記脂肪酸が特に好ましいとされるのは、そのアルキル鎖の長さがリボソーム脂質層への楔形配向にとって適当なものであるためであると考えられる。

次に多糖質と脂肪酸とのエステルの製造は、概略以下のごとくおこなうことができる。まず、多糖質を無水ジメチルホルムアミドに60〜70℃で加熱溶解する。無水ピリジンと無水ジメチルホル

ムアンドに脂肪酸塩化物をあらかじめ溶解したものを加え、60～10℃で数時間、続いて室温で24時間攪拌する。反応終了後、反応混合物にエタノールを加えると白色沈殿が析出するので、これを濾取し、エタノールで洗浄し、さらにエーテルに分散して再び濾取する。減圧乾燥し、所定のエステルを得る。

ここに得られるエステルは、IRスペクトル(KBr法)、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(溶媒 $d_6$ -DMSO、内部標準TMS)によって特定することができるが、さらに脂肪酸置換度を求めることができる。

脂肪酸置換度とは糖単位100個に対する脂肪酸の導入個数を言い、これは以下のように $^1\text{H-NMR}$ によって測定される。例えばパルミトイル基が導入されている場合、その導入量は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて0.9 ppmおよび1.28 ppmに現われるパルミトイル基のプロトンのピーク面積と3.5～5.2 ppmに現われる糖中のプロトンのピーク面積との比によって与えられる。すなわち

糖単位100個中に $x$ 個のパルミトイル基が置換されている場合には、糖のプロトン数は $9x+10$ ( $100-x$ )であり、またパルミトイル基のプロトン数は $31x$ である。従って $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの積分曲線から求められる糖のプロトン数を $y$ 、またパルミトイル基のプロトン数を $z$ とすると、

$$x = \frac{1,000z}{31y + z}$$

である。かくのごとくして求められる置換度を本発明において使用されるエステルについて測定してみると、置換度は低い方が好ましい結果を与えることが判明し、例えば0.5～5程度で十分である。

また、本発明に係るエステルをリボソームに被覆させるには、リボソームが形成している水溶液にエステル含有水溶液を加えて攪拌すればよい。被覆に当たっては単一のエステルを被覆すればよいが、2種以上の本発明に係るエステルを組合わせ、いわゆる複合エステルとして被覆してもよい。

以下に記載する実施例をもって、本発明並びにリボソームを安定化する本発明の効果をさらに詳細に説明する。

#### 実施例 1

##### 試料

リボソームに担持される水溶性物質として6-カルボキシフルオレッセイン(以下6-CFと略)を使用した。

この6-CFは、高濃度において濃度消光によりケイ光を発しない。従って、高濃度(200mM)の6-CFをリボソーム内水相にトラップすれば、ケイ光の増加を観測することにより6-CFのリボソーム内水相から外水相への漏れを調べることができる。

次に6-CFを内水相に含むリボソームは、以下のごとく調製した。

卵黄レシチン30mgを50ml容ナス型フラスコにクロロホルム2mlと共に加えて、完全に溶解してからロータリー・エバポレーターで減圧下で溶媒

を完全に除去し、卵黄レシチンの薄膜を作製した。これを減圧デシケーター中で一夜乾燥させ、クロロホルムを完全に除去した。次にこのフラスコに数個のガラスビーズを入れて200mM 6-CF水溶液(pH 8.6 NaOHで調整)2mlを加えてから、Vortex mixerで薄膜をはがしてリボソーム膜を形成させた。この操作を2回くりかえして計4mlに分散した。次に水上で窒素雰囲気下、超音波処理(25W、1分ごとに30秒停止)を20分行った。ここに得られたリボソームに表1記載のごとき5種類のエステル $\alpha$ 乃至 $\epsilon$ を被覆した。

表 1

エステル	多糖質	脂肪酸	多糖質分子量	脂肪酸置換度
a	pullulan	パルミチン酸	50000	3.4
b	pullulan	パルミチン酸	50000	4.8
c	pullulan	パルミチン酸	243000	0.7
d	pullulan	パルミチン酸	243000	1.0
e	amylopectin	パルミチン酸	112000	4.9

被覆は以下のごとくおこなった。超音波処理してリボソームが形成している6-CF溶液(200mM pH 8.6)4 mlにエステル水溶液(30mg/ml)1 mlを加えて20℃で1時間スターラーで攪拌した。次にこれをSephacose 4Bカラム(φ18mm×600mm)で200mM NaCl, 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)を展開溶媒としてゲル通過を行なった。溶媒の滴下速度は5秒に1滴とし、フラクション40まで採取した。フラクション単位当たり120滴で約4 mlであった。その溶出過程を6-CFの510 nmの吸収を紫外可視分光光度計で追跡することにより溶出曲線を得た。これより多重層および1枚膜リボソームを含むフラクションを採取した。溶出曲線を図1に示す。

以上のごとくにして調製された被覆リボソーム含有水溶液を検体試料として、以下に記載する方法によりリボソーム内水相から流出した6-CFの経時変化を求めた。なお、対照試料として被覆処理をおこなわずに上記ゲル通過をおこなって得られたものを使用した。

が多重層リボソームである場合、図3はリボソームが単層(1枚膜)リボソームである場合における6-CFの流出を示す図であり、図中、○印線は対照試料、◎印線はエステルa、△印線はエステルb、▲印線はエステルc、●印線はエステルeをそれぞれ被覆した検体試料についてのものである。

図2および図3より、本発明に係るエステルによってリボソーム膜を被覆することにより、内容成分の放出を急速なるものに、あるいは緩徐なるものにそれぞれ適宜に制御できることが判明した。

図4はリボソームがエステルaを被覆した多重層リボソームである場合の6-CFの放出を示す図であり、図中◎印線は対照試料、▲印線はエステル量が卵黄レシチンに対して2倍、△印線は1倍、●印線は1/3倍である各検体試料についてのものである。図4より、卵黄レシチン30mgに対してエステルaを10~30mgの範囲で調節することにより、内容成分の放出を適宜コントロール出来ることが判明した。

## 方法

(1) まず卵黄レシチン30mgに対してエステル30mgを用いてリボソーム膜をコーティングした際の6-CFの流出を経時的に測定した。測定は50℃で行い6-CFの520nmのケイ光の増加を追跡した(Ex 470nm)。

なお、リボソーム内水相にトラップされた6-CFの量は1mlのリボソーム溶液に10 vol %のTriton X-100水溶液を30 ml加えることによりリボソーム膜を壊し、その時の6-CFの520nmのケイ光強度を測定することにより求めた。このケイ光強度の値を100とし、6-CFの流出によるケイ光強度の増加を%単位で算出した。

(2) 次に表1記載のエステルaを用いて6-CFの流出に対するエステルの緩度効果を検討した。(この実験においては、卵黄レシチン30mgに対してエステルaを60mg, 30mg, 10mgコーティングしたものを用いた。)

## 結果

結果を図2乃至図4に示す。図2はリボソーム

## 実施例 2

(ホスホリパーゼの攻撃に対する安定化)

### 試料

実施例1試料の項の記載において200mM 6-CF水溶液(pH 8.6 NaOHで調整)の代わりに緩衝液(pH 8.6)2 mlを加えた点を除いて同項記載における同じ方法により被覆リボソーム(1枚膜リボソーム)含有水溶液を調製して検体試料とした。なお、エステルとしては表1記載のエステルaを使用し、その添加量は卵黄レシチン $3.4 \times 10^{-4}$  M (0.26mg/ml)に対して0.5mg/3.2 mlとした。また対照試料としては、上記検体試料の調製において、被覆処理をおこなわずに、そのままゲル通過をおこなって得られたものを使用した。

### 方法と定量

試料を37℃, pH 8.0(200mM Tris-HCl緩衝液)に調節し、ここにホスホリパーゼD(PLDと略記する)を加え、PLDにより卵黄レシチンが加水分解を受けてリボソームが破壊する状態を経時的に追跡した。測定は8-アザリノ

—1—ナフタレンスルホン酸ナトリウム (ANS と略記する) を指示薬としてあらかじめ試料中に加えておき、その490 nmにおけるケイ光強度を経時的に測定しておこなった。すなわちANSは水溶液中ではほとんどケイ光を発しない物質であるが、水溶液中にリボソームが存在すると、その膜表面に吸着して強いケイ光を発するようになる。従ってPLDによりリボソームが破壊を受けるとANSは膜表面から水中へ放出されてケイ光強度が減少するようになる。この現象を利用して前記のごとき測定をおこなった。

#### 結果

結果を図5に示す。図中、○印線は対照試料、●印線は検体試料におけるものを示す。図5より明らかなようにエステルでコーティングしたリボソームのケイ光強度の減少はコーティングされていないリボソームのものに比べておさえられている。これはエステルでリボソーム膜表面をコーティングすることにより、卵黄レシチンをPLD攻撃から保護しているためであることが判明する。

#### 4. 図面の簡単な説明

図1は実施例1記載における図1に相当する図面であり、ゲル透過における溶出曲線を示す。

図2および図3は実施例1記載における図2および図3に相当する図面であり、リボソームが多重層リボソームおよび単層リボソームであるそれぞれの場合における6-CFの流出を示す。

図4は実施例1記載における図4に相当する図面であり、リボソームがエステルを被覆した多重層リボソームである場合の6-CFの流出を示す。

図5は実施例2記載における図5に相当する図面であり、ホスホリパーゼ-Dによってリボソームが破壊される結果、ケイ光強度が減少する状況を示す。

図 1

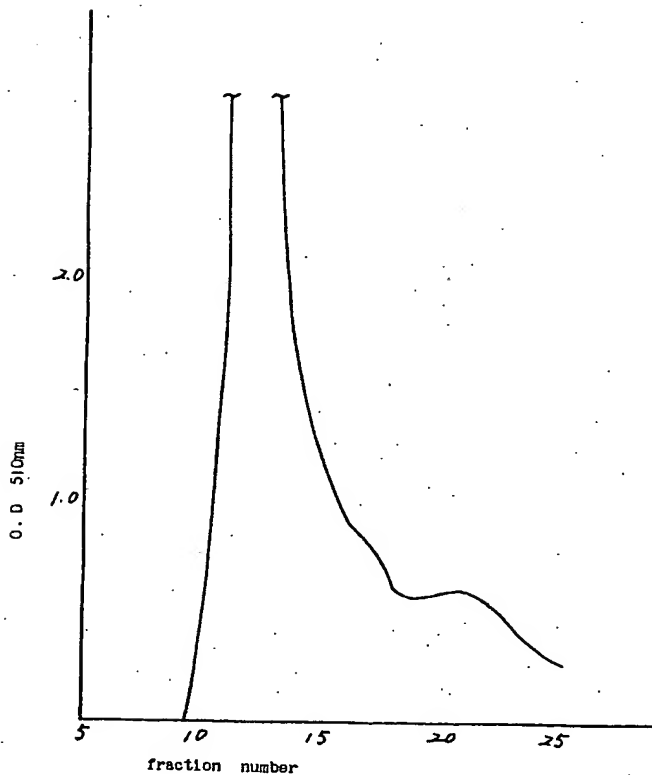
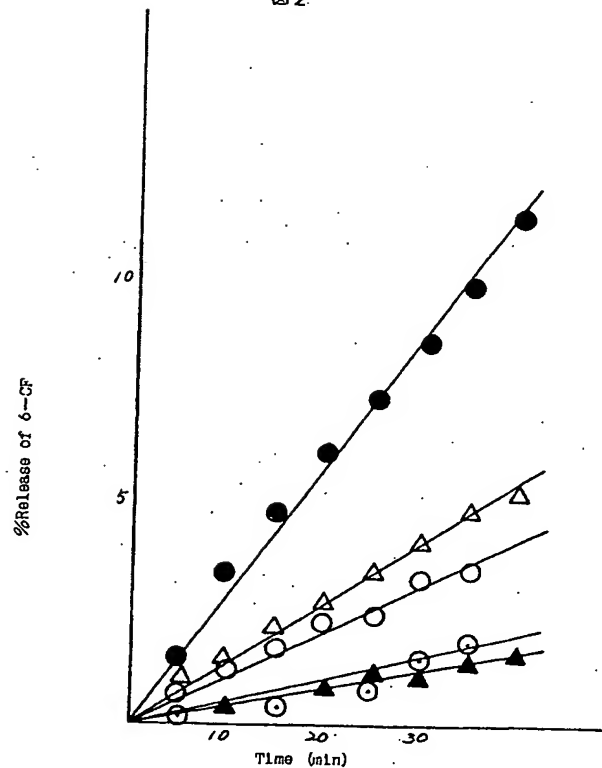


図2



手続補正書（自発）

特開昭58-49311(7)

昭和56年10月27日

特許庁長官 島田 春樹 殿

1. 事件の表示

昭和56年特許願第147587号

2. 発明の名称

安定なるリボソームの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

ブナキョウコイシカワ

住 所 東京都文京区小石川4丁目6番10号

名 称 (021) エーザイ株式会社

代 表 者 内 藤 祐 次

4. 補正の対象

(1) 明細書の発明の詳細な説明の欄

(2) 明細書全文

5. 補正の内容

(1) 第11頁下から4行目の「DMSO<sub>4</sub>」とあるのを「DMSO」に補正する。

(2) 明細書の序書（上記(1)以外の内容に変更なし）

